

Efecto de antibióticos en la propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem

Enildo Abreu, Maryla Sosa del Castillo, Gerardo Asuncion del Sol, Gerardo González

Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas. Autopista a Varadero km 3 ½. Matanzas. Matanzas. Cuba. CP 44740. e-mail: enildo.abreu@umcc.cu

RESUMEN

La elevada contaminación microbiana en la propagación *in vitro* del henequén (*Agave fourcroydes* Lem) reduce la eficiencia. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del uso de antibióticos en el control de contaminantes bacterianos de este cultivo. Se identificaron los contaminantes bacterianos y se determinó su susceptibilidad a diferentes antibióticos. Los dos antibióticos de mejores resultados se adicionaron al medio de cultivo de propagación y se cuantificó el número de explantes contaminados con bacterias y necróticos. El antibiótico y la concentración que no ocasionó fitotoxicidad a los explantes y donde se obtuvo el menor porcentaje de contaminación se empleó para continuar la propagación de las plantas. Estas se transfirieron a la fase de aclimatación y a los 30 días de cultivo se cuantificó el número de plantas vivas y el número de raíces por planta. Además, se midió la longitud de las raíces (cm) y se calculó el área foliar. Se comprobó la presencia *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Agrobacterium* spp., *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*. Los antibióticos ensayados inhibieron el crecimiento *in vitro* de los contaminantes aislados y los mejores resultados se obtuvieron con Ticar y Cefotaxima. Adicionados al medio de cultivo de propagación de las plantas, Ticar fue fitotóxico por encima de 50 mg l⁻¹ y cefotaxima puede utilizarse a 100 mg l⁻¹ sin ocasionar daños a los explantes. Los resultados demostraron que las plantas que provenían del medio de cultivo con cefotaxima 100 mg l⁻¹ mostraron un incremento significativo de las variables evaluadas en la fase de aclimatación.

Palabras clave: betalactámicos, henequén, micropropagación

Effect of antibiotics on *Agave fourcroydes* Lem *in vitro* propagation

ABSTRACT

High microbial contamination on henequen (*Agave fourcroydes* Lem) *in vitro* propagation reduces its efficiency. This work aimed to determine the effect of the use of antibiotics in the control of bacterial contaminants of this culture. Bacterial contaminants were identified and their susceptibility to different antibiotics it were determined. The two best-acting antibiotics were added to the propagation medium and the number of explants contaminated with bacteria and necrotics was quantified. The antibiotic and concentration that did not cause phytotoxicity to the explants and where the lowest percentage of contamination was obtained it was used to continue the propagation of the plants. These were transferred to the acclimatization stage and at 30 days of culture the number of live plants and the number of roots per plant were quantified. In addition, the length of the roots (cm) was measured and the leaf area was calculated. *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Agrobacterium* spp., *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* were found. The antibiotics tested inhibited the *in vitro* growth of the isolated contaminants and the best results were obtained with Ticar and Cefotaxime. Added to the plant propagation medium, Ticar was phytotoxic over 50 mg l⁻¹ and cefotaxime could be used at 100 mg l⁻¹ without causing damage to the explants. The results showed that the plants that came from the culture medium with cefotaxime 100 mg l⁻¹ showed a significant increase of the variables evaluated in the acclimatization stage.

Key words: betalactamic, henequen, micropropagation

INTRODUCCIÓN

Agave fourcroydes Lem. es una especie perenne, de propagación vegetativa, se cultiva en áreas ecológicas con limitado suministro de agua y suelos pobres (Garriga *et al.*, 2010; Kulus, 2014). Tiene, además, alto potencial de

uso como fuente de productos naturales como esteroides y detergentes a partir de sus sapogeninas (Sosa *et al.*, 2014).

Para satisfacer las demandas del mercado de plantas de *Agave* se han aplicado herramientas biotecnológicas en diferentes especies

(Madrigal *et al.*, 1990; Robert *et al.*, 1992; González *et al.*, 2000; González *et al.*, 2011; Robert *et al.*, 2006; Garriga *et al.*, 2010). Sin embargo, al igual que en otras plantas, se presentan dificultades entre las que se encuentran el bajo potencial de regeneración, la hiperhidricidad de los explantes y la presencia de contaminantes endofíticos o asociados a errores humanos durante la transferencia de los cultivos (Kulus, 2014).

Entre los contaminantes microbianos, las bacterias causan pérdidas elevadas en el cultivo *in vitro* de plantas (Leifert y Waites, 1992). El uso de antibióticos incorporados al medio de cultivo es una de las alternativas para disminuirlas aunque su aplicación se ve restringida debido a sus posibles efectos fitotóxicos sobre el material vegetal (Robert *et al.*, 2006; Fang y Hsu, 2012; Mbah y Wakil, 2012; Sabale *et al.*, 2015).

En una de las especies de agave más trabajadas por cultivo *in vitro*; *Agave tequilana* Weber, Castillo-Campohermoso (2002) informó que se presentaron problemas de contaminación bacteriana, pero no pudieron ser controlados de manera efectiva con antibióticos. Sin embargo, el empleo de un extracto comercial de toronja (*Citrus grandis* Osbeck) con conocida actividad antimicrobiana resultó factible para el control de los microorganismos contaminantes (Obledo-Vázquez *et al.*, 2004).

La propagación *in vitro* del henequén (*Agave fourcroydes* Lem) (Garriga *et al.*, 2010) pudiera contribuir a la recuperación del cultivo en el país, sin embargo la elevada contaminación microbiana reduce la eficiencia de este proceso pero no se encontraron referencias sobre el uso de antibióticos para su control.

Atendiendo a la problemática existente este trabajo se propuso determinar el efecto del uso de antibióticos en el control de contaminantes bacterianos que afectan la producción de plantas *in vitro* de henequén.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en el Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, Matanzas, Cuba.

Material vegetal

Para el cultivo *in vitro* se emplearon plantas de henequén variedad 'Sac Ki' como material vegetal inicial. Estas procedían de plantaciones comerciales en la Empresa Henequenera Eladio Hernández. Las plantas se seleccionaron teniendo en cuenta elevado vigor, longitud de las hojas entre 120 y 130 cm y número de hijos basales entre cinco y siete. El material vegetal se propagó según lo descrito por Garriga *et al.* (2010).

Identificación de contaminantes y susceptibilidad a antibióticos

Se separaron frascos visiblemente contaminados donde se observaba una película alrededor de los explantes. Se realizaron aislamientos en placas de Petri con medio de cultivo que contenía triptona 10 g l⁻¹, extracto de levadura 5 g l⁻¹, NaCl g l⁻¹, glucosa 10 g l⁻¹ y agar 20 g l⁻¹, pH 7.2. Las placas se incubaron a 30°C durante 24h y las colonias aisladas se purificaron en similar medio de cultivo.

Se observaron las características culturales de las colonias en microscopio estereocopio y se realizaron preparaciones frescas y teñidas para observar los caracteres morfológicos (forma, agrupación, motilidad, respuesta al Gram). Además, se hicieron pruebas fisiológico-bioquímicas como la fermentación de carbohidratos (glucosa, lactosa, manitol, sacarosa), actividad catalasa y oxidasa, sensibilidad a colistina, producción de indol y de amina, hidrólisis de urea y liberación de CO₂. Para estas pruebas se emplearon los medios de cultivo agar de hierro y triple azúcar (TSI), Citrato de Simmons, Agar de hierro y lisina (LIA), Agar Urea, Medio MIO (motilidad, indol y ornitina). Para la identificación de los contaminantes bacterianos se emplearon los criterios del *Manual of Systematic Bacteriology* (Garrity *et al.*, 2005) y Madigan *et al.* (2009).

A todos los aislamientos se le realizaron antibiogramas mediante el método de Kirby-bauer con discos de los antibióticos Bacitracina, Cefotaxima, Penicilina, Estreptomycin, Rifampicina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Ticar (Ticarcilina) y Eritromicina (Oxoid). Se seleccionaron dos antibióticos donde se formara halo de inhibición en todos

los aislados. Cada ensayo fue replicado tres veces para los contaminantes aislados.

Efecto de antibióticos

Para evaluar la efectividad de los antibióticos contra los contaminantes bacterianos se emplearon por separado los dos antibióticos seleccionados previamente. Se adicionaron al medio de cultivo diferentes concentraciones (25, 50, 100, y 1000 mg l⁻¹) y se tomó como control el medio de cultivo sin antibiótico. Se establecieron 40 individuos (dos explantes por frasco) por tratamiento.

Los frascos se colocaron en cámara de crecimiento con luz solar a 26 ± 2°C (37.5 μmol m² s⁻¹ de luminosidad como promedio) durante 30 días. Se cuantificó el número de explantes contaminados con bacterias y el número de explantes necróticos por tratamiento. Se seleccionó el antibiótico y la concentración que no ocasionó fitotoxicidad a los explantes (expresada como necrosis o clorosis de los explantes) y donde se obtuvo el menor porcentaje de contaminación.

Posteriormente, se continuó la propagación de las plantas (Garriga *et al.*, 2010) en medio de cultivo con y sin antibiótico a la concentración seleccionada y se transfirieron a fase de aclimatación donde se tuvieron en cuenta de forma general los criterios referidos por Abreu *et al.* (2007).

El experimento se desarrolló en casa de cultivo donde las plantas se colocaron en bandejas de poliestireno expandido con 70 alvéolos. Se empleó como sustrato una mezcla de pulpa de henequén descompuesta al 10% con zeolita. Se emplearon 40 plantas de réplica para cada tratamiento, la humedad ambiental se mantuvo entre 80 y 90%. A los 30 días de cultivo se cuantificó el número de plantas vivas y se calculó el porcentaje de supervivencia, el número de raíces por planta, se midió la longitud de las raíces (cm) y se calculó el área foliar (AF) (cm). AF= largo x ancho x 0.68 (constante), según Abreu (2009).

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se empleó el programa Statgraphics Versión 5.0 (2000). Los resultados se procesaron estadísticamente a

través de un análisis de varianza de clasificación simple, con un diseño completamente aleatorizado. Los datos en porcentajes se transformaron según $X = 2\arcsin(X/100)$ 0.5. Para detectar la diferencia entre las medias se realizó un ANOVA y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para el 5% de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó la presencia de contaminantes bacterianos en los frascos de cultivo pertenecientes a *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Agrobacterium* spp., *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*.

Los resultados de este estudio demostraron que el empleo de métodos de desinfección superficial del material vegetal procedente de plantaciones comerciales no garantizó la eliminación de los contaminantes bacterianos. Las especies identificadas se han encontrado en el suelo, asociadas a plantas y como contaminantes de diferentes cultivos propagados *in vitro* (Leifert y Waites, 1992; Reed *et al.*, 1995; Asif *et al.*, 2013).

Con el cultivo *in vitro* se obtienen cultivos asépticos que favorecen su propagación. Pero si se tiene en cuenta que los tejidos de los cuales se parte para iniciar el cultivo provienen del campo entonces, la probabilidad de la contaminación por virus, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, es elevada (Niubó *et al.*, 2004).

Los antibióticos ensayados inhibieron el crecimiento *in vitro* de los contaminantes aislados. Los mayores halos de inhibición en los aislados Gram negativos se observaron con el antibiótico Ticar mientras que Cefotaxina inhibió el crecimiento tanto de bacterias Gram negativas como Gram positivas. A partir de estos resultados se seleccionaron estos dos antibióticos.

En la mayor concentración para ambos antibióticos se produjo el menor número de explantes contaminados con diferencias significativas con el resto de las concentraciones ensayadas. Sin embargo, en presencia de esta concentración se produjo el mayor número de explantes necrosados, los cuales no sobrevivieron (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de los antibióticos Ticar y cefotaxima en el establecimiento *in vitro* de henequén.

Antibiótico (mg l ⁻¹)	Ticar		Cefotaxima	
	No. de explantos	No. de explantos	No. de explantos	No. de explantos
	contaminados	necróticos	contaminados	necróticos
0	33.0a	0d	31.0a	0b
25	25.0b	0d	23.0b	0b
50	20.0c	5.0c	21.0b	0b
100	15.0d	30.0b	12.0c	0b
1000	1.0e	39.0a	1.0d	25.0a
Es	2.04	2.95	2.31	3.41

Es: Error estándar. Medias con letras distintas en cada columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan. $n=40$

Los primeros individuos necróticos con el empleo de Ticar se observaron a partir de 50 mg l⁻¹, mientras que con cefotaxima fue a 1000 mg l⁻¹. Este resultado indicó que Ticar presentó mayor fitotoxicidad ya que a menor concentración se observó clorosis y necrosis de los tejidos que alcanzó hasta el 97.5% de los explantes con 1000 mg l⁻¹.

Con cefotaxima 1000 mg l⁻¹ se redujo la contaminación bacteriana en un 75% con respecto al control pero se perdió el 62.5% de los explantes por necrosis mientras que con 100 mg l⁻¹ aunque la reducción fue menor no se observaron explantes necróticos.

Diferentes autores han informado que el uso de cefotaxima en el cultivo *in vitro* de plantas produce menores efectos fitotóxicos que otros antibióticos y reduce la contaminación bacteriana (Danilova y Dolgikh, 2004; Grewal *et al.*, 2006; Asif *et al.*, 2013; Sabale *et al.*, 2015). Coincidiendo con los resultados de este trabajo, Barrueto y Zimmermann (2006) informaron que la adición de Cefotaxima 100 mg l⁻¹ ayudó en el control de contaminación bacteriana persistente sin afectar el crecimiento y coloración de yemas axilares de yuca (*Manihot esculenta*) cultivadas *in vitro*. Sin embargo, Sabale *et al.* (2015) con la incorporación al medio de cultivo de cefotaxima 1000 mg l⁻¹ alcanzaron un control efectivo de la contaminación bacteriana en la micropropagación de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) sin fitotoxicidad.

A partir de los resultados se seleccionó el antibiótico Cefotaxima a 100 mg l⁻¹. No se recomienda el empleo de Ticar en la

micropropagación del henequén a partir de fuentes de explantes procedente de condiciones de campo, pues se necesitan elevadas concentraciones para controlar las contaminaciones que provocan un elevado número de individuos necrosados, una disminución del crecimiento vegetal y no controla contaminantes bacterianos Gram positivos.

Los resultados demostraron que las plantas que provenían del medio de cultivo con cefotaxima 100 mg l⁻¹ mostraron un incremento significativo de las variables evaluadas en la fase de aclimatización (porcentaje de supervivencia, número y longitud de las raíces y área foliar) con respecto a las plantas del tratamiento control sin antibiótico (Tabla 2).

De modo general, se puede señalar que las plantas tratadas con Cefotaxima, mostraron un vigor superior y color verde más intenso en comparación con las plantas controles. No se evidenció en ninguno de los casos, la presencia de anomalías morfológicas y tampoco se observaron afectaciones de la pigmentación de las hojas.

Estos resultados están en correspondencia con los informados por otros autores que refieren un efecto estimulante de Cefotaxima en el cultivo *in vitro* de plantas (Mittal *et al.*, 2009; Asif *et al.*, 2013). En este sentido, Danilova y Dolgikh (2004) comprobaron que la adición de este antibiótico estimulaba la regeneración de plantas de *Zea mays* L. Sin embargo, este es el primer informe del efecto estimulante de Cefotaxima en la propagación de *A. fourcroydes*.

Tabla 2. Respuesta de plantas *in vitro* de henequén en fase de aclimatización después de la aplicación de Cefotaxima durante la propagación *in vitro*.

Tratamiento	Supervivencia (%)	No. de raíces	Longitud de las raíces (cm)	Área foliar (cm ²)
Cefotaxima (100 mg l ⁻¹)	97a	5.90a	5.50a	6.17a
Control	90b	4.08b	4.42b	4.25b
Es	2.21	1.20	0.08	0.90

Es: Error estándar. Medias con letras distintas en cada columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan

CONCLUSIONES

El uso de los antibióticos Ticar y Cefotaxima en la propagación *in vitro* de *A. fourcroydes* permite reducir las pérdidas por contaminación bacteriana y los resultados dependen de la concentración utilizada. En el caso de Ticar, por encima de 50 mg l⁻¹ se observa fitotoxicidad en los explantes. Sin embargo, cefotaxima puede incluirse en el medio de cultivo a 100 mg l⁻¹ y estimula el crecimiento vegetal.

REFERENCIAS

- Abreu EO (2009) Aclimatización de plántulas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) y su evaluación en la etapa de previvero. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba
- Abreu E, González G, Ortiz R, Rodríguez P, Domech R, Garriga M (2007) Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) durante la fase de aclimatización. Cultivos Tropicales 28 (1): 5-11
- Asif M, Eudes F, Randhawa H, Amundsen E, Yanke J, Spaner D (2013) Cefotaxime prevents microbial contamination and improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. Plant Cell Rep 32(10):1637-1646; doi: 10.1007/s00299-013-1476-4
- Barrueto LP, Zimmermann MA (2006) Contaminação *in vitro* de plantas. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília
- Castillo-Campohermoso MA (2002) Eliminación de bacterias contaminantes de cultivo de *Agave tequilana* Weber. Tesis de maestría en Ciencias, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México
- Danilova SA, Dolgikh YI (2004) The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. Russ J Plant Physiol 51:559-562; doi: 10.1021-4437/04/5104-0559
- Fang JY, Hsu YR (2012) Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micro propagated *Aglaonema* cultures. Plant Cell Tiss Org Cult 110:53-62; doi: 10.1007/s11240-012-0129-6
- Garriga M, González G, Alemán S, Abreu E, Quiroz K, Caligari PDS, García-González R (2010) Manejo de la interacción auxina-citoquinina para mejorar el protocolo micropropagación de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) Chilean Journal of Agricultural Research 70(4): 545-551
- Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR (eds) (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, East Lansing; doi: 10.1007/0-387-28022-7
- González G, Alemán S, Abreu E, Figueroa H, Toapanta P, Doam C (2011) Evaluación de la cosecha de plantas seleccionadas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) y propagadas *in vitro*. Revista Ciencia Amazónica 2 (2): 13-16
- González G, Alemán S, Trujillo R, Domech R, Abreu E, Pérez Y (2002) Influencia del 6 Benciladenina sobre el comportamiento *in vitro* de plantas de henequén obtenidas a partir de embriones. Biotecnología vegetal 2(4): 235-238
- González G, Alemán S, Infante D (2000) Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: Selection among individuals in clonally propagated population. Plant Science 165 (3): 595-601
- Grewal D, Gill R, Gosal SS (2006) Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in indica rice. Biotechnol J 1:1158-1162; doi: 10.1002/biot.200600139
- Kulus M (2014) Micropropagation of selected *Agave* species. En: Czubenko M (ed). PhD Interdisciplinary Journal, pp. 75-84. Politechnika Gdańska, Gdańsk; doi: 10.13140/2.1.1482.6565

- Leifert C, Waites WM (1992) Bacterial growth in plant tissue culture media. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 460-466
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (eds) (2009) *Brock Biología de los microorganismos*. ADDISON-WESLEY, New Jersey; ISBN: 9788478290970
- Madrigal LR, Pineda EF, Rodríguez de la O JL (1990) Agave. *Handbook of Plant Cell Culture*. En: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Bajaj Y (eds). *Ornamental Species*, pp. 206-227. McGraw-Hill Publishing Co, New York
- Mbah EI, Wakil SM (2012) Elimination of bacteria from *in vitro* yam tissue cultures using antibiotics. *J Plant Pathol* 94:53-58
- Mittal P, Gosal SS, Senger A, Kumar P (2009) Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. *Physiol Mol Biol Plants* 15:257-265; doi: 10.1007/s12298-009-0029-3
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologiae Plantarum* 15:473-497
- Niubó E, Díaz P, Oliva O, Portieles R, Díaz A, Ancheta O, Rodríguez S, Soto A, Sánchez C (2004) Metodología para la obtención *in vitro* de plantas y tejidos de la caña de azúcar libres de contaminantes exófitos y endófitos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 35 (3): 55-161
- Obledo-Vázquez EN, Flores-Verduzco N, Cervantes-Martínez J (2004) Detección del efecto de un extracto vegetal antimicrobiano sobre plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) cultivadas *in vitro* utilizando fluorescencia inducida por láser (LIF). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22 (3): 328-332
- Reed BM, Buckley PM, Dewilde TN (1995) Detection and eradication of endophytic bacteria from micro propagated mint plants. *In Vitro Cell Dev Biol- Plant* 31:53-57
- Robert ML, Herrera JL, Chan JL, Contreras F (1992) Micropropagation of *Agave* spp. En: Bajaj JPY (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, pp. 306-329. Springer-Verlag, Berlin
- Robert ML, Herrera-Herrera JL, Castillo E, Ojeda G, Herrera-Alamillo MA (2006) An Efficient Method for the Micropropagation of *Agave* Species. En: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (eds). *Methods in Molecular Biology*, pp. 165-178. Humana Press, New Jersey; doi: 10.1385/1-59259-959-1:165
- Sabale SN, Patil DM, Gokhale NB, Sawardekar SV, Sawant SS (2015) Elimination of bacterial contamination by using antibiotics in micropropagation of banana (*Musa* spp.) cv. Grand naine *Journal of Cell and Tissue Research* 15(2): 5111-5115
- Sosa M, Alemán S, Pérez Y, Abreu E, Sosa D, González G (2014) Caracterización de la lámina foliar de plantas de *Agave fourcroydes* Lem. obtenidas por propagación asexual. *Biotecnología Vegetal* 14 (1): 37-44

Recibido: 23-02-2014

Aceptado: 17-06-2015